ет большие возможности как для работ по генной коррекции, так и по генной терапии млекопитающих, что, в свою очередь, так или иначе может быть связано с сохранением популяций. В работах [9, 10, 11, 12] нам удалось впервые продемонстрировать перенос генов в составе молекулярных конструкций в клетки молочных желез мышей и овец и в эмбрионы мышей и кроликов с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Сохранение исчезающих видов животных с помощью клонирования, в том числе в сочетании с криоконсервацией, имеет большие перспективы. Для этого есть и технологии, и устройства, накоплен также большой опыт экспериментирования при использовании в качестве объектов как лабораторных животных, так и различных сельскохозяйственных животных. Есть также возможности для работы в условиях дикой природы и в зоопарках.

С использованием криобанков сохранение генетического материала путем клонирования и развитие методов репрограммирования для соматического клонирования позволят преодолеть многие проблемы сохранения исчезающих видов животных на нашей Планете с помощью прямого их воспроизведения.

SUMMARY

Embryonic and somatic cloning is one of the methods for endangered animals preservation for it offers the great opportunities for conserving of genetic material outside cryobank and restoration of population in zoo and wildlife animals. Although the main achievements in mammalian cloning are connected with the usage of technology of nuclei transfer, the yield of intact preimplantation embryos and live births is extremely low (0,1-3%), and the new births have serious abnormalities. Basing on our own experiments in cloning we analyse in details the peculiarities and difficulties of several the stages of the technique of nuclear transfer and offer the new methods, new devices and technology approaches.

Литература

1. Андреева Л.Е., Серова И.А. Повреждающее действие микроманипуляционной техники, применяемой для трансгенеза, на развитие мышей. Онтогенез. 1992, 23, 637-643.
2. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. Nat. Rev. Genet. 2000, 1, 199-207.
3. Чайлахян Л.М., Вепринцев Б.Н., Свиридова Т.А., Никитин В.А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии. Биофизика, 1987, том XXXII, вып. 5. С. 874-887.
4. Осташко Ф.И., Никитин В.А., Гордиенко Н.А., Безуглый Н.Д., Кот В.В., Микрохирургическое разделение деконсервированных эмбрионов крупного рогатого скота, Республиканская научно-практическая конференция: “О широком использовании метода трансплантации эмбрионов в ускорении качественного совершенствования сельскохозяйственных животных”, Львов, 1987, 22-23 дек. С. 57-58.
5. Никитин В.А., Фесенко Е.Е. Биофизические аспекты реконструкции единичной клетки методами клеточной инженерии. Биофизика, 2006, 51 (4).
6. Никитин В.А. Техника изготовления микроинструментов для исследования клеток под микроскопом. Пущино, 1986, 122с. (под ред. проф. Б.Н. Вепринцева).
7. Кононенко В.Л., Никитин В.А., Абраскова С.В., Леткевич В.И. «Микроигла для клонирования доимплантационных эмбрионов животных», авт. св. № 1727821.
8. Nikitin V.A., Khokhlov A.M., Larin V.T., Fikhte B.A. Proc’ed’e d’intervention microchirurgicale sur les cellules et dispositif pour sa mise en oeuvre N de publication: 2 553 432.
9. Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. Receptor-mediated transport of foreign DNA into preimplantation mammalian embryos. Mol. Reprod. Dev., 1999; 54, 112-120.
10. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K., Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. J. Biol. Chem., 1998, 273, 7928-7933.
11. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Иванова М.М., Смирнова О.А., Никитин В.А., Народицкий Б.С., Эрнст Л.К. «Способ получения трансгенных животных», Патент РФ № 2108714.
12. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Никитин В.А. «Способ направленной генетической трансформации молочной железы животного и устройство для введения генетического материала в молочный проток молочной железы животного», Патент РФ № 20252487.

В.А. Науменкова, О.В Васильева

ВНИИ коневодства

СРАВНЕНИЕ ЗАПАДНОЙ И РОССИЙСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

В 2005 году в нашей лаборатории появилась возможность испытать импортное оборудование для замораживания спермы жеребцов по западной технологии. Эту возможность нам предоставил Локотской К.З., который приобрел оборудование и

разбавители в немецкой фирме «Минитуб» и любезно предоставил его нам.

Мы использовали технологию Loomis et al., (1983), которая представляет собой модифицированную немецкую технологию Martin J.C. et. al., (1979) с отличием по режиму центрифугирования и объему фасовки в 0,5 мл соломины. Эта технология наиболее распространена в Европе, все другие базируются на основе данной технологии с применением подобных приемов и разбавителей.

Перед нами была поставлена задача испытать западную технологию и сравнить ее с нашими отечественными технологиями замораживания семени жеребцов.

Исследование было проведено в виде сравнительного опыта по 3-м технологиям:

1 – российская технология замораживания семени в больших объемах 15-20 мл (Романькова Н.К., 1969),

2 – российская технология в малых объемах 5-6 мл (Фомина Е.Л., 1990)

3 – западная технология в соломинах по 0,5 мл (Loomis et al., 1983). Сравнение проводили по этапам подготовки спермы к замораживанию с целью выявления наиболее выгодных параметров в обработке спермы. Мы выделили три основных этапа технологии – это разбавление, центрифугирование и конечный выход спермодоз.

1-ый этап – разбавление. В опыте было установлено, что западные авторы, стремясь уменьшить объем спермы, пренебрегают оптимальной степенью разбавления, рекомендуя разбавлять сперму в 2 раза, в то время как оптимальной степенью для спермы жеребца является степень разбавления в 4 раза. Опыт, представленный в таблице 1, показал, что подвижность и переживаемость спермиев повышается при увеличении степени разбавления импортной средой (М-2). Отступление от этой закономерности ведет к некоторому смешению осмотических процессов. В результате устойчивость спермиев к дальнейшим процедурам охлаждения и замораживания снижается. Выдерживает процесс криоконсервации сперма только очень высокого качества. Это приводит к уменьшению возможностей замораживания спермы среднего качества.

2-ой этап – центрифугирование. Исследование показало, что при центрифугировании в оптимальном режиме не происходит полного осаждения спермиев, т.е. часть половых клеток остаются над осадком. В дальнейшем надосадочная жидкость удаляется. С целью кардинального снижения объема все западные авторы рекомендуют удалять как можно больше надосадочной плазмы: до 90%. По российской технологии замораживания семени в малых объемах (Фомина Е.Л. и др.,1988) рекомендуется удаление 50-60% надосадка. Мы расчитали и увидели, что чем больше удаляется надосадочной жидкости, тем больше, при этом, теряется спермиев, которые не осели на дно центрифужной пробирки (таблица 2). При удалении 90% надосадка выбрасывается до 20% спермев, т.е. заведомо удаляется 20% спермодоз.

3-ий этап- это выход количества спермодоз.

Во-первых, потери спермиев на втором этапе при удалении надосадочной жидкости после центрифугирования приводят к заведомой потере спермиев в количестве 20% или выбросу 20% спермодоз.

Во-вторых, все технологии замораживания спермы в миниобъемах предусматривают компенсацию объема за счет повышения количества подвижных спермиев в дозе, которое необходимо доводить до уровня 300-500 млн. По данным Palmer et.al. (1984) количество подвижных спермиев должно быть не менее 300 млн, по данным Pickett et.al. (1987) оно должно лежать в пределах 400-500 млн на одно осеменение. По российским технологиям допустимо использование на осеменение 150-200 млн подвижных спермиев в дозе в оптимальном объеме (15-20 мл).

Потери спермодоз будут зависеть от начальной концентрации спермы конкретного жеребца, т.к. это индивидуальный по-

Таблица 1

Влияние различных степеней разбавления импортной средой М2 на показатели спермы после оттаивания

Показатели спермы после оттаивания	Степень разбавления средой М2				Контроль с центриф. (по Фоми-ной)	Контроль без центриф.
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:3	1:3
Активность (баллы)	2,0±0,17	2,0±0,16	2,5±016	2,5±0,18	2,5±0,17	2,5±0,19
Переживае-мость (часы)	126±10	154±12	170±14	169±13	178±16	172±15

Таблица 2

Влияние удаления различного количества надосадочной жидкости после центрифугирования на показатели замороженно-оттаянной спермы

К-во удаленной надосадочной жидкости%	Активность перед замораж. (баллы)	Активность после оттаивания (баллы)	Переживаемость после оттаивания (часы)	Потери спермиев, %
Западная технология (Loomis)				
50	4,0±0,18	2,3±0,11	107±11	3,7
60	4,0±0,18	2,3±0,11	113±14	6,0
70	4,0±0,19	2,3±0,12	142±11	9,0
80	4,0±0,19	2,3±0,12	162±12	12.0
90	4,0±0,19	2,3±0,13	144±16	20.0
Отечественная технология (Фомина Е.Л.)				
50	4,0±0,20	2,4±0,12	270±20	2.0
60	4,0±0,19	2,4±0,12	264±23	4,0
70	4,0±0,18	2,37±0,11	258±27	5,6
80	4,0±0,19	2,37±0,12	259±26	10,0
90	4,0±0,20	2,37±0,11	240±22	17,0
Отечественная технология без центрифугирования (контроль)				
0	4,0±0,1	2,4±0,12	270±18	0

казатель, и концентрация спермиев колеблется в пределах от 100 до 500 млн/мл.

Если начальная концентрация спермы составляет менее 300 млн, то из одного эякулята, подготовленного к замораживанию по западной технологии, получится меньше доз, чем по российской технологии Только в том случае, если концентрация спермиев не менее или выше 300 млн/мл, то потерь спермодоз не происходит.

Исследование показало, что подготовка семени к замораживанию по западной технологии, с достижением кардинального уменьшения объема спермодозы, приводит к снижению качественных показателей спермиев и их дополнительной потере. При этом возникает необходимость повышения требований к качеству семени жеребцов, использованию для замораживания семени только с высокой активностью и высокой концентрацией, ограничению использования для консервации семени среднего качества.

Российская технология замораживания семени в малых объемах (5 мл) не приводит к большой потере спермиев. Технология замораживания семени в больших объемах (15-20 мл) предполагает щадящий режим воздействия на спермии и дает возможность использовать для консервации семя среднего качества. Кроме того, при этом достигается возможность снизить в дозе количество подвижных спермиев за счет объема.

SUMMARY

As a result of the comparative analysis of Western and Russian stallion semen cryopreservation technologies in steps of freezing preparation, we singled out the most optimal parameters of sperm treatment.

Литература

1. Рекомендации по замораживанию и длительному хранению в жидком азоте спермы жеребцов-производителей, 1978
2. Фомина Е.Л., Мирошникова К.И. Новое в технологии криоконсервации спермы жеребцов в малых объемах // Современное состояние и перспективы развития научных исследований по коневодству, Тез. докл. всесоюз. науч. совещания, ВНИИК, 1989. С. 65-66
3. Cochran J.D. et. al. Effect centrifugation, glycerol level, cooling to 5 C, frizing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology 1984, 22, 25-38.
4. Klug E. et al. Cryopreservation of stallion spermatozoa. Acta vet.scand. 1992, suppl. 88, 129-135.
5. Loomis P.R. et al. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-edd yolk and packaged in straws. J. Anim Sci., 1983, 56, 687-693.
6. Martin J.C. et, al. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J Reprod Fertil, 1979, Suppl 27, 47-51.
7. Palmer E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. 10th Inter. Cong. Anim. Reprod. and A.I. Champain Urbana, 1984. Vol. 111 № 3, P. 377-379.
8. Pickett B.W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil Steril. 1975, 26, 167-174.
9. Tischner M. Zamrazanie nasienia ogierow i insemiacja klaczy. -Medycyna Wet., 1999, № 55(8), P. 507-512.